

10/524424

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. März 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/018639 A1(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C08B 35/00,  
30/20, A61K 47/36, 31/718, A01N 1/02, G01N 33/49,  
A61M 1/36

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SOMMERMEYER,  
Klaus [DE/DE]; In der Laubach 26, 61191 Rosbach v.d.H.  
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/08757

(74) Anwälte: MAI, Peter usw.; Luderschmidt, Schüler &  
Partner, John-F.-Kennedy-Strasse 4, 65189 Wiesbaden  
(DE).(22) Internationales Anmeldedatum:  
6. August 2002 (06.08.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 41 099.9 22. August 2001 (22.08.2001) DE(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HYPERBRANCHED AMYLOPECTIN FOR USE IN METHODS FOR SURGICAL OR THERAPEUTIC TREAT-  
MENT OF MAMMALS OR IN DIAGNOSTIC METHODS, ESPECIALLY FOR USE AS A PLASMA VOLUME EXPANDER(54) Bezeichnung: HYPERVERZWEIGTES AMYLOPEKTIN ZUM EINSATZ IN VERFAHREN ZUR CHIRURGISCHEN  
ODER THERAPEUTISCHEN BEHANDLUNG VON SÄUGERN ODER IN DIAGNOSTIZIERVERFAHREN, INSBESONDERE  
ZUR VERWENDUNG ALS PLASMAVOLUMENEXPANDER(57) Abstract: The invention relates to the use of hyperbranched amylopectin which has an average branch degree of between > 10 and 25 mol % and a molecular weight (Mw) ranging from 40.000 - 800.000 Dalton and the derivatives thereof in methods for surgical or therapeutic treatment of human or animal bodies or in a diagnostic method, preferably as a plasma volume expander. Plasma volume expanders based on hydroxy-ethylated amylopectin have, as a result of hydroxy ethylation, hitherto exhibited the disadvantage of incomplete metabolism and thus temporary tissue storage which is linked to side-effects. According to the invention, novel plasma expanders based on polysaccharides which do not exhibit the same disadvantages as the former are provided. Improved, completely metabolised plasma expanders based on hyperbranched amylopectin which can be obtained therefrom so that native plant-amylopectins are altered by transglycosylation in such a way the adjustable, high degree of branching enables control of the serum- $\alpha$ -amylase decomposition so that no or only a very insignificant degree of hydroxy ethylation is necessary.

WO 03/018639 A1

(57) Zusammenfassung: Verwendung von hyperverzweigtem Amylopektin, das einen mittleren Verzweigungsgrad zwischen > 10 und 25 mol% und ein Molekulargewicht Mw im Bereich von 40.000 bis 800.000 Dalton aufweist, und dessen Derivaten in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers oder in Diagnostizierverfahren, bevorzugt als Plasmavolumenexpander. Plasmavolumenexpander auf Basis von hydroxyethyliertem Amylopektin weisen, bedingt durch die Hydroxyethylierung, bislang noch den Nachteil der nicht vollständigen Metabolisierbarkeit und damit vorübergehender Gewebespeicherung, die mit Nebenwirkungen verbunden ist, auf. Es sollen neue Plasmaexpander auf Basis von Polysacchariden gefunden werden, die diesen Nachteil nicht aufweisen. Verbesserte, vollständig metabolisierbare Plasmaexpander auf Basis von hyperverzweigtem Amylopektin erhält man beispielsweise dadurch, dass native Pflanzen-Amylopektine durch Transglycosylierung so verändert werden, dass der einstellbare, hohe Verzweigungsgrad eine Steuerung des Serum- $\alpha$ -Amylaseabbaus ermöglicht, so dass keine oder nur sehr geringfügige Hydroxyethylierung notwendig ist. Es sollen neue Plasmaexpander auf Basis von Polysacchariden gefunden werden, die diesen Nachteil nicht aufweisen. Verbesserte, vollständig metabolisierbare Plasmaexpander auf Basis von hyperverzweigtem Amylopektin erhält man beispielsweise dadurch, dass native Pflanzen-Amylopektine durch Transglycosylierung so verändert werden, dass der einstellbare, hohe Verzweigungsgrad eine Steuerung des Serum- $\alpha$ -Amylaseabbaus ermöglicht, so dass keine oder nur sehr geringfügige Hydroxyethylierung notwendig ist.



TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Hyperverzweigtes Amylopektin zum Einsatz in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung von Säugern oder in Diagnostizierverfahren, insbesondere zur Verwendung als Plasmavolumenexpander**

Die vorliegende Erfindung betrifft den Einsatz von hyperverzweigtem Amylopektin.

Speziell richtet sich die Erfindung auf eine neuartige Verwendung von hyperverzweigtem Amylopektin, das einen bestimmten Verzweigungsgrad und ein bestimmtes Molekulargewicht  $M_w$  aufweist.

In der Geschichte der Entwicklung der Plasmavolumenexpander war es immer ein Ziel, die globuläre Struktur des natürlichen Trägers des kolloidosmotischen Druckes im Serum, des Albumins, zu erreichen. Dieser globulären Struktur kommt das Glycogen, welches ebenfalls als natürliches Speicherpolysaccharid im menschlichen Organismus vorkommt, nahe. Seine globuläre Struktur erreicht das Glycogen durch seinen sehr hohen Verzweigungsgrad. Strukturell stellt das Glycogen ein Glucosepolysaccharid dar mit in linearen Abschnitten  $\alpha$ -1,4 glycosidischen Bindungen an denen  $\alpha$ -1,6 glycosidische Verzweigungspunkte fixiert sind. Weil Glycogen selbst nicht als eine billige Rohstoffquelle zur Verfügung steht, schlug Wiedersheim 1957 vor, an dessen Stelle das geringer verzweigte Amylopektin als Ausgangsmaterial zur Herstellung des Plasmaexpanders Hydroxyethylstärke (HES) einzusetzen. Mittlerweile wird Hydroxyethylstärke in mehreren verschiedenen Typen sehr breit als Plasmaexpander eingesetzt. Die Entwicklung hat zu neuen Hydroxyethylstärke-Typen (HES-Typen) geführt, die einen optimalen Volumeneffekt aufweisen bei sonst minimalen Nebenwirkungen wie z. B. Beeinflussung der Gerinnung oder aber auch intermediäre Speicherung im Gewebe.

Die verschiedenen im Markt befindlichen HES-Typen unterschieden sich im Bezug auf Molekulargewicht, mittleren Substitutionsgrad und Substitutionsmuster.

Trotz des beachtlichen Fortschritts, der mit diesen Entwicklungen erreicht wurde, verbleiben einige Nachteile auch bei den in den letzten Jahren optimierten HES-Typen, vor allem die nicht vollständige Metabolisierbarkeit.

Es ist bekannt, dass die Hydroxyethyl-Ethergruppe chemisch aber auch metabolisch außerordentlich stabil ist, so dass diejenigen Anhydroglucose-Einheiten der Hydroxyethylstärke, die Hydroxyethyl-Ethergruppen tragen, praktisch nicht metabolisierbar sind. Weiterhin ist bekannt, dass nur diejenigen  $\alpha$ -1,4 glycosidischen Bindungen im Hydroxyethyl-Stärkemolekül durch die Serum- $\alpha$ -Amylase gespalten werden können, die durch nicht substituierte Glucoseeinheiten gebildet werden. Aus diesem Grunde ist festzustellen, dass selbst bei den optimierten HES-Typen eine minimale aber immer noch bemerkenswerte Gewebespeicherung zumindest über gewisse Zeiträume festgestellt werden kann.

Als weiterer Nachteil ist festzustellen, dass HES nicht die ideale globuläre Struktur des Albumins aufweist und deshalb seine Grenzviskosität bedeutend höher ist als die von Albumin. Eine niedrigere Viskosität ist bei einem Plasmaexpander deshalb wünschenswert, weil nach dessen Applikation in die Zirkulation die Gesamtblutviskosität im Sinne einer Erniedrigung beeinflusst werden würde.

Es bestand daher die Aufgabe, neue verbesserte Plasmaexpander auf Amylopektinbasis zu entwickeln, die die Nachteile der fehlenden vollständigen Metabolisierbarkeit des Amylopektinderivates Hydroxyethylstärke nicht aufweisen. Gleichzeitig sollte der neue Plasmaexpander eine mehr globuläre Struktur aufweisen und damit relativ niedrigviskose Lösungen bilden.

Es kann auch als Aufgabe der Erfindung angesehen werden, weitere Einsatzgebiete für bestimmte Amylopektine zu erschließen.

Diese Aufgaben sowie weitere nicht einzeln aufgeführte Aufgaben, die sich jedoch zwanglos aus der einleitenden Erörterung ableiten lassen, werden durch den Gegenstand des Anspruchs 1 gelöst. Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der auf Anspruch 1 rückbezogenen Ansprüche.

Dadurch, dass man hyperverzweigtes Amylopektin, das einen mittleren Verzweigungsgrad zwischen  $> 10$  und  $25 \text{ mol}\%$  und ein Molekulargewicht  $M_w$  im Bereich von  $40.000$  bis  $800.000$  Dalton aufweist, und ggf. seine Derivate in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (also von Säugern) oder in Diagnostizierverfahren einsetzt, gelingt es auf nicht ohne weiteres vorhersehbare Weise zum einen für hyperverzweigtes Amylopektin eine Reihe von neuen und interessanten Anwendungen im medizinischen Bereich zu erschließen. Zum anderen wird speziell bezogen auf den Sektor „Plasmavolumenexpansion“ ein nahezu idealer, weit weniger zu gefährlichen Nebenwirkungen führender, Ersatzstoff für die zur Zeit in der Praxis noch gängigen HES-Produkte auf Stärkebasis bereit gestellt.

Im Bezug auf die Plasmavolumenexpansion wurde nämlich im Rahmen der Erfindung durch aufwendige Studien und Untersuchungen festgestellt, dass die Restfraktionen von Hydroxyethylstärke im Blutstrom und im Urin einige Stunden oder sogar Tage nach Applikation eines Plasmaexpanders eine starke Zunahme des Verzweigungsgrades aufwiesen im Vergleich zur original infundierten Hydroxyethylstärke (HES-Produkt). So stiegen die Verzweigungsgrade, ausgedrückt als  $\text{mol}\%$  der Anhydroglucosen, die Verzweigungspunkte tragen, von ca.  $5 \text{ mol}\%$  auf über  $7 \text{ mol}\%$  2 Stunden nach Applikation und auf  $8 \text{ mol}\%$  7 Stunden nach Applikation an. Gleichzeitig zeigte sich 48 bzw. 42 Stunden nach Infusion in den Urin-Sammelfractionen ein noch

höherer Verzweigungsgrad von 9 bzw. 10 mol-%. Dieses Phänomen wurde beobachtet unabhängig von Molekulargewicht, Substitutionsgrad oder Substitutionsmuster der applizierten Hydroxyethylstärke. Das bedeutet, dass diese Fraktionen sich beim Abbau immer mehr einer Glycogen-ähnlichen Struktur bzw. Verzweigung nähern, die in der Literatur mit ca. bis zu 10 mol-% Verzweigung angegeben wird.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass die relative Stabilität der  $\alpha$ -(1,6)-Verzweigung in Amylopektin und in Derivaten davon ausgenutzt werden kann, um den Abbau von Amylopektin gegenüber dem dominierenden  $\alpha$ -Amylase-Abbau soweit zu reduzieren, dass ein vollständig abbaubares Polysaccharid hergestellt werden kann, welches aber immer noch die Eigenschaften eines idealen Plasmaexpanders im Bezug auf Pharmakokinetik bzw. Volumeneffekt aufweist.

Die Erfindung umfasst daher die Verwendung von hypervverzweigten Amylopektinen und von Derivaten solcher hypervverzweigten Amylopektine auf dem medizinischen Sektor.

Unter Amylopektinen versteht man dabei zunächst ganz allgemein verzweigte Stärken oder Stärkeprodukte mit  $\alpha$ -(1-4)- und  $\alpha$ -(1-6)-Bindungen zwischen den Glucosemolekülen. Die Verzweigungen der Kette erfolgen dabei über die  $\alpha$ -(1-6)-Bindungen. Diese sind bei natürlich vorkommenden Amylopektinen etwa alle 15-30 Glucosesegmente unregelmäßig vorhanden. Das Molekulargewicht von natürlichem Amylopektin liegt sehr hoch im Bereich von  $10^7$  bis zu  $2 \times 10^8$  Dalton. Man geht davon aus, dass auch Amylopektin in gewissen Grenzen Helices bildet.

Man kann für Amylopektine einen Verzweigungsgrad definieren. Das Maß für die Verzweigung ist das Verhältnis der Zahl von Molekülen Anhydroglucose, die Verzweigungspunkte ( $\alpha$ -(1-6)-Bindungen) tragen, zur Gesamtzahl Moleküle

der Anhydroglucose des Amylopektins, wobei dieses Verhältnis in mol-% ausgedrückt wird. In der Natur auftretendes Amylopektin weist Verzweigungsgrade von ca. 4 mol-%. Allerdings ist bekannt, dass Cluster und Molekülabschnitte von Amylopektin bei isolierter Betrachtung einen geringfügig höheren Verzweigungsgrad aufweisen als naturgemäß der Durchschnittsverzweigungsgrad.

Hyperververzweigte Amylopektine sind im Sinne der Erfindung nun solche Amylopektine, die einen über den aus der Natur für Amylopektine bekannten Verzweigungsgrad signifikant hinausgehenden Verzweigungsgrad aufweisen. Dabei handelt es sich beim Verzweigungsgrad in jedem Falle um einen Mittelwert (mittleren Verzweigungsgrad), da Amylopektine polydisperse Substanzen sind.

Solche hyperververzweigte Amylopektine weisen signifikant höhere Verzweigungsgrade, ausgedrückt als mol-% der Verzweigungsanhydroglucosen, auf im Vergleich zu unverändertem Amylopektin bzw. Hydroxyethylstärke und sind demzufolge in ihrer Struktur dem Glycogen ähnlicher.

Der für den erfindungsgemäßen Einsatz erforderlich mittlere Verzweigungsgrad der hyperververzweigten Amylopektine liegt im Bereich zwischen > 10 und 25 mol%. Dies bedeutet, dass die im Sinne der Erfindung nützlichen Amylopektine im Mittel etwa alle 10 bis 4 Glucoseeinheiten eine  $\alpha$ -(1-6)-Bindung und damit einen Verzweigungspunkt aufweisen. Liegt der Verzweigungsgrad unterhalb von 10 mol-% ist der Abbau des verzweigten Amylopektins (z. B. beim Einsatz als Plasmaexpander) nicht ausreichend verzögert. Ist der Verzweigungsgrad größer als 25 mol-% ist der Abbau zu stark verzögert, so dass ein Einsatz beispielsweise als Plasmavolumenexpander ausscheidet.

Eine bevorzugt im medizinischen Bereich einsetzbare Amylopektintype kennzeichnet sich durch einen Verzweigungsgrad zwischen 11 und 16 mol-%.

Weitere bevorzugte hyperverzweigte Amylopektine besitzen einen Verzweigungsgrad im Bereich zwischen 13 und 16 mol-%.

Daneben kommt auch dem Molekulargewicht  $M_w$  des hyperverzweigten Amylopektins eine Bedeutung zu. Das Molekulargewicht  $M_w$  bezeichnet das Gewichtsmittel des Molekulargewichts, wie es mit einschlägigen Methoden, die diesen Mittelwert liefern, gemessen werden kann. Hierzu gehören beispielsweise wässrige GPC, HPLC, Lichtstreuung und dergleichen.

Die in der Erfindung einsetzbaren hyperverzweigten Amylopektine besitzen im Allgemeinen einen Wert für das Gewichtsmittel des Molekulargewichts  $M_w$  im Bereich von 40.000 bis 800.000 Dalton. Der untere Grenzwert für den Molekulargewichtsbereich  $M_w$  ergibt sich bei den bevorzugten Anwendungen im Wesentlichen aus der sogenannten „Nierenschwelle“, die bei hyperverzweigten Verbindungen bei eben etwa 40.000 anzusetzen ist. Ist das  $M_w$  kleiner als 40.000 Dalton, würden die Moleküle zu schnell über die Niere abfiltriert werden. Oberhalb eines  $M_w$  von 800.000 Dalton wird kein zusätzlicher nennenswerter Nutzen erzielt, obwohl bei globulären Strukturen die Grenzviskosität nicht mehr vom Molekulargewicht abhängt.

Bevorzugt für den Einsatz als Plasmavolumenexpander sind Mittelwerte  $M_w$  zwischen 90.000 und 300.000 Dalton, ganz besonders zweckmäßig sind Molekulargewichte  $M_w$  zwischen 120.000 und 250.000 Dalton.

Eine besondere Ausgestaltung der Erfindung umfasst hyperverzweigtes Amylopektin, wobei der mittlere Verzweigungsgrad zwischen 11 und 16 mol% und das Molekulargewicht  $M_w$  zwischen 90.000 und 300.000 Dalton ist. Weiterhin zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung schließen hyperverzweigtes Amylopektin ein, wobei der mittlere Verzweigungsgrad zwischen 13 und 16 mol% und das Molekulargewicht  $M_w$  zwischen 120.000



und 250.000 Dalton ist.

Die vorgenannten Parameter Verzweigungsgrad und Molekulargewicht gestatten eine Ziel gerichtete Beeinflussung und somit Einstellung einer gewünschten Pharmakokinetik, insbesondere das Erreichen eines erwünschten  $\alpha$ -Amylase-Abbaus. Dem Verzweigungsgrad des Amylopektins kommt hierbei eine Schlüsselbedeutung zu. Aber auch das Molekulargewicht hat einen Einfluss auf die angesprochene Kinetik. Daneben kann es auch durch Variation der Verteilung der Verzweigungspunkte gelingen, die Kinetik des Abbaus des Amylopektins in eine gewünschte Richtung zu beeinflussen.

Von ganz besonderer Bedeutung für den Abbau des Amylopektins durch  $\alpha$ -Amylase und damit für die Funktion als Plasmavolumenexpander ist jedoch der Verzweigungsgrad. Aufgrund des hohen Verzweigungsgrades erfolgt der Angriff der  $\alpha$ -Amylase stark verzögert bzw. in Bereichen des Moleküls mit einer starken Dichte an Verzweigungspunkten gar nicht mehr, da dort der Zutritt der  $\alpha$ -Amylase nicht mehr möglich ist. Solche Verbindungen sind dennoch abbaubar durch andere Enzyme bis herab zu Oligosacchariden und schließlich Glucose.

Im Bedarfsfalle können die erfindungsgemäß anzuwendenden hypervverzweigten Amylopektine derivatisiert werden. Derlei Derivate umfassen chemische Abkömmlinge des Amylopektins, wie sie beispielsweise durch chemische oder biotechnologische Umsetzungen erhältlich sind.

Bevorzugte Derivate des hypervverzweigten Amylopektins sind Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl- und Acetyl-Amylopektin. Hiervon wiederum ist Hydroxyethyl-Amylopektin ganz besonders günstig einsetzbar. Auch durch die Derivatisierung ist mithin die Kinetik des Abbaus des Amylopektins beeinflussbar. Es ist jedoch von Vorteil, dass der Grad der Derivatisierung, beispielsweise der Hydroxyethylierungsgrad, in diesen Fällen erheblich niedriger sein muss, um einen vergleichbaren Volumeneffekt bzw. eine ähnliche Pharmakokinetik zu erzielen.

aufzuweisen, im Vergleich zu einer Hydroxy-ethylstärke (HES), die aus normal verzweigtem Amylopektin hergestellt worden ist.

Die Herstellung von hypervverzweigtem Amylopektin, welches im Sinne der Erfindung unter anderem und bevorzugt zum Einsatz als Plasmaexpander geeignet ist, erfolgt in an sich bekannter Weise durch enzymatische Umwandlung durch sogenannte Verzweigungsenzyme, die die Hydrolyse der  $\alpha$ -1,4- glycosidischen Bindungen und ihre Transformation in  $\alpha$ -1,6-glycosidische Verbindungen katalysieren. Solche sogenannten Transfer-Enzyme können in an sich bekannter Weise z. B. aus Algen extrahiert werden gemäß PCT WO 0018893. Es sind aber auch aus dem US-Patent 4454 161 und EP 0418 945 andere Glycogen-Verzweigungsenzyme bekannt, die ebenfalls entsprechend eingesetzt werden können. Die Durchführung der enzymatischen Transglycosilierung erfolgt in an sich bekannter Weise beispielsweise durch Inkubation von Wachsmaisstärke mit den entsprechenden Enzymen unter schonenden Bedingungen bei pH-Werten um ca. 7,5 und Temperaturen bei ca. 30 °C in wässriger Lösung. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes erfolgt anschließend in ebenfalls bekannter Weise, wobei zuvor durch pH-Wert Veränderung bzw. Filtrationsschritte die Enzyme deaktiviert oder entfernt werden.

In einem anschließenden Hydrolyseschritt, der vorzugsweise durch Salzsäure erfolgt, wird dann das gewünschte Molekulargewicht des Produktes eingestellt. Anschließend wird das Produkt durch Diafiltration mit Membranen mit einem cut off von ca. 3.000 Dalton von niedermolekularen Verbindungen sowie Kochsalz, welches bei der Neutralisation des sauren Hydrolyseansatzes entsteht, befreit. Das Produkt wird beispielsweise durch Sprühtrocknung isoliert.

Neben dem Einsatz als Plasmavolumenexpander sind die hypervverzweigten Amylopektine auch in anderen Bereichen der Medizin nutzbringend einsetzbar.

So kann das hypervverzweigte Amylopektin bei all denjenigen Anwendungen in der Therapie und Chirurgie zum Einsatz kommen, wo auch übliche HES-Produkte auf Basis normal verzweigter Stärken einsetzbar sind.

Neben der Anwendung als Plasmavolumenexpander handelt sich hierbei vorzugsweise um den Einsatz zur Verbesserung der Mikrozirkulation, die Anwendung als Sedimentationshilfe bei der Zellseparation im Rahmen der Leukapherese oder den Einsatz zur Kryokonservierung von Blutkomponenten wie Erythrozyten oder Granulozyten.

#### **Modell-Beispiel 1**

**Vergleichende Abbauprobungen mit unterschiedlich verzweigten  
 $\alpha$ -1-4 /  $\alpha$ -1-6- Glucosacchariden**

Glycogen von der Auster der Fa. SIGMA wurde durch thermoresistente  $\alpha$ -Amylase BAN 480 L der Fa. NOVOZYMES in einer DMSO / Wassermischung mit 30 %igem Anteil an DMSO bei 70 °C und pH Wert von 6,0 abgebaut. Der Reaktionsablauf wurde dabei durch Messung der Molekulargewichtsveränderung mittels Gelchromatographie verfolgt und nach ca. 2 Stunden wurde die Reaktion abgestoppt durch Zugabe von Natronlauge zur Enzyminaktivierung. Nach Neutralisation wurde das Produkt fraktioniert durch Ultrafiltration mittels Cellulose-Acetat-Ultrafilter mit einem nominellen cut-off von 1.000 D und 25.000 D zur Entfernung niedermolekularer Anteile sowie noch hochmolekularer Anteile. Das Produkt wurde anschließend mit Ionenaustauscher Amberlite IR 200 C sowie Aktivkohle behandelt, mit Ethanol gefällt und bei 80 °C getrocknet.

Der Verzweigungsgrad bestimmt über  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie (Integration der Signale der anomeren Protonen) ergab einen Verzweigungsgrad von 15 mol%, das mittlere Molekulargewicht  $M_w$  betrug 7.000 Dalton.

Dünnkochende Wachsmaisstärke ( $\geq 95$  % Amylopektin) (Fa. Cerestar) wurde in der gleichen Weise behandelt wie vorbeschrieben. Die isolierte, hochverzweigte Fraktion der Verzweigungscluster wies einen Verzweigungsgrad von 11 mol% auf, das mittlere Molekulargewicht  $M_w$  betrug 8.000 Dalton.

Die hochverzweigten Clusterfraktionen aus Amylopektin und Glycogen wurden danach einem Abbauersuch durch Schweinepankreas  $\alpha$ -Amylase (Fa. Roche) in Phosphatpuffer pH 7,2 in 1%iger Lösung bei 37° C und 0,5 IU/ml Enzym unterworfen und die Abbaukinetik verfolgt durch Messung der Molekulargewichtsveränderungen mittels Gel-Chromatographie. Ebenfalls wurde ein Vergleichsversuch des Abbaus mit einem handelsüblichen Hydroxyethylstärke-Plasmaexpander durchgeführt (Voluven, Fa. Fresenius Kabi). Dabei waren deutliche Unterschiede in den Abbaukinetiken zu verzeichnen. Die Halbwertszeit des Molekulargewichts (Abbau des mittleren Molekulargewichts  $M_w$  der Ausgangssubstanz auf die Hälfte des Ausgangswertes) betrug im Falle der Fraktion mit einem Verzweigungsgrad von 15 % 60 Minuten und erreichte dabei die unter gleichen Versuchsbedingungen ermittelte Halbwertszeit wie der Plasmaexpander Voluven.

Die Halbwertszeit für die Fraktion mit einem mittleren Verzweigungsgrad von 11 mol% betrug hingegen nur 25 Minuten und war damit wesentlich kürzer.

## Modell-Beispiel 2

Dünnkochende Wachsmaisstärke der Fa. Cerestar mit einem mittleren, durch NMR bestimmten Verzweigungsgrad von 4 mol% wurde entsprechend den

Angaben aus Beispiel 1 einem Abbauprobe durch Schweinepankreas  $\alpha$ -Amylase unterworfen. Hierzu wurde eine 1%ige Lösung im Phosphatpuffer pH 7,2 durch kurzes Erhitzen auf ca. 90 °C verkleistert und dem Ansatz nach Abkühlung das Enzym in einer Menge zugesetzt, dass 0,5 I.E. pro ml resultierten.

Die Versuchstemperatur betrug 37° C.

Die Abbaukinetik wurde verfolgt durch die Erfassung der Molekulargewichtsveränderungen durch Gel-Chromatographie. Unter gleichen Bedingungen wie im Beispiel 1 reduzierte sich das Molekulargewicht der Ausgangssubstanz auf den halben Wert innerhalb von 10 Minuten.

Im Vergleich zu den hochverzweigten  $\alpha$ -1-4 /  $\alpha$ -1-6 Glucosacchariden aus Beispiel 1 wird somit die im mittel relativ niedrigverzweigte, dünnkochende Wachsmaisstärke so schnell durch  $\alpha$ -Amylase abgebaut, dass sie als Plasmaexpander nicht verwendbar wäre.

Damit demonstrieren die beiden Modell-Beispiele 1 und 2, dass, auch wenn die Molekulargewichte niedrig sind, eine höhere Verzweigung zu einer Verzögerung des  $\alpha$ -Amylase-Abbaus führt und dass dieser Effekt zur Herstellung eines Plasmaexpanders einsetzbar ist.

**Patentansprüche**

1. Hyperverzweigtes Amylopektin, das einen mittleren Verzweigungsgrad zwischen > 10 und 25 mol% und ein mittleres Gewichtsmittel des Molekulargewichts Mw im Bereich von 40.000 bis 800.000 Dalton aufweist, und Derivate davon zur Anwendung in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers oder in Diagnostizierverfahren.
2. Hyperverzweigtes Amylopektin nach Anspruch 1 als Plasmavolumenexpander.
3. Hyperverzweigtes Amylopektin nach Anspruch 1 zur Verbesserung der Mikrozirkulation.
4. Hyperverzweigtes Amylopektin nach Anspruch 1 als Sedimentationshilfe bei der Zellseparation im Rahmen der Leukapherese.
5. Hyperverzweigtes Amylopektin nach Anspruch 1 zur Kryokonservierung von Blutkomponenten wie Erythrozyten oder Granulozyten.
6. Hyperverzweigtes Amylopektin nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der mittlere Verzweigungsgrad zwischen 11 und 16 mol% und das Molekulargewicht Mw zwischen 90.000 und 300.000 Dalton ist.
7. Hyperverzweigtes Amylopektin nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 5 wobei der mittlere Verzweigungsgrad zwischen 13 und 16 mol% und das Molekulargewicht Mw zwischen 120.000 und 250.000 Dalton ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/08757

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08B35/00 C08B30/20 A61K47/36 A61K31/718 A01N1/02  
601N33/49 A61M1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B A61K A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 075 839 A (SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT ) 14 February 2001 (2001-02-14) column 4, line 32 - line 39 claims 1,6,10,11	1,2,5-7
X	WO 00 18893 A (ROQUETTE FRERES) 6 April 2000 (2000-04-06) cited in the application page 2, line 17 - line 25 page 17 -page 19; example 4	1
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 2002

Date of mailing of the international search report

20/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Mazet, J-F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/08757

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; "Manufacture of highly-branched starch inhibition of retrogradation of starch, and food containing the starch" retrieved from STN Database accession no. 135:317549 XP002222974 abstract & JP 2001 294601 A (AKITA PREFECTURE) 23 October 2001 (2001-10-23) ---	1
A	DE 33 13 600 A (LAEVOSAN-GESELLSCHAFT MBH) 18 October 1984 (1984-10-18) claims ---	1,2
A	GB 1 279 356 A (AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORPORATION) 28 June 1972 (1972-06-28) claims ---	1,5
X	GUNJA ZEENAT ET AL.: "Enzymic conversion of amylopectin into a glycogen-type polysaccharide" CHEM. & IND., 1959, page 1017 XP008011341 London the whole document -----	1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/08757

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1075839	A	14-02-2001	AT 137499 A EP 1075839 A1	15-05-2002 14-02-2001
WO 0018893	A	06-04-2000	FR 2783838 A1 AU 5632099 A CA 2345331 A1 EP 1115843 A1 WO 0018893 A1	31-03-2000 17-04-2000 06-04-2000 18-07-2001 06-04-2000
JP 2001294601	A	23-10-2001	NONE	
DE 3313600	A	18-10-1984	DE 3313600 A1 US 4629698 A	18-10-1984 16-12-1986
GB 1279356	A	28-06-1972	CA 928215 A1 CH 536115 A DE 2039182 A1 FR 2068474 A1 IT 1050113 B JP 49028965 B NL 7011085 A ,B, SE 395835 B	12-06-1973 30-04-1973 18-02-1971 27-08-1971 10-03-1981 31-07-1974 10-02-1971 29-08-1977

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08757

## A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C08B35/00 C08B30/20 A61K47/36 A61K31/718 A01N1/02  
G01N33/49 A61M1/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08B A61K A01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 075 839 A (SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT) 14. Februar 2001 (2001-02-14) Spalte 4, Zeile 32 - Zeile 39 Ansprüche 1,6,10,11 ---	1,2,5-7
X	WO 00 18893 A (ROQUETTE FRERES) 6. April 2000 (2000-04-06) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 17 - Zeile 25 Seite 17 -Seite 19; Beispiel 4 --- -/-	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

2. Dezember 2002

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

20/12/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Mazet, J-F

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08757

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	<p>DATABASE CHEMABS 'Online!            CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,            OHIO, US;            "Manufacture of highly-branched starch            inhibition of retrogradation of starch,            and food containing the starch"            retrieved from STN            Database accession no. 135:317549            XP002222974            Zusammenfassung            &amp; JP 2001 294601 A (AKITA PREFECTURE)            23. Oktober 2001 (2001-10-23)</p>	1
A	<p>DE 33 13 600 A (LAEVOSAN-GESELLSCHAFT MBH)            18. Oktober 1984 (1984-10-18)            Ansprüche</p>	1,2
A	<p>GB 1 279 356 A (AMERICAN HOSPITAL SUPPLY            CORPORATION) 28. Juni 1972 (1972-06-28)            Ansprüche</p>	1,5
X	<p>GUNJA ZEENAT ET AL.: "Enzymic conversion            of amyopectin into a glycogen-type            polysaccharide"            CHEM. &amp; IND. ,            1959, Seite 1017 XP008011341            London            das ganze Dokument</p>	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08757

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 1075839	A	14-02-2001	AT EP	137499 A 1075839 A1	15-05-2002 14-02-2001
WO 0018893	A	06-04-2000	FR AU CA EP WO	2783838 A1 5632099 A 2345331 A1 1115843 A1 0018893 A1	31-03-2000 17-04-2000 06-04-2000 18-07-2001 06-04-2000
JP 2001294601	A	23-10-2001	KEINE		
DE 3313600	A	18-10-1984	DE US	3313600 A1 4629698 A	18-10-1984 16-12-1986
GB 1279356	A	28-06-1972	CA CH DE FR IT JP NL SE	928215 A1 536115 A 2039182 A1 2068474 A1 1050113 B 49028965 B 7011085 A ,B, 395835 B	12-06-1973 30-04-1973 18-02-1971 27-08-1971 10-03-1981 31-07-1974 10-02-1971 29-08-1977